

РАЗДЕЛ I ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ: ОБЩИЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА *IN VIVO* НА МЕТАБОЛИЗМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС

Акопова О.В.¹, Коцюруба А.В.², Коркач Ю.П.¹, Сагач В.Ф.¹

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины¹,

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины², Украина

Избыточное накопление Ca^{2+} в митохондриях, сопровождаемое открытием митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) и гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), индуцирует развитие клеточного апоптоза [1], что в итоге ведет к патологии сердечно-сосудистой системы. Митохондрии являются одной из мишеней комплексного кардиопротекторного действия NO.

Однако, хотя к настоящему времени установлена важная роль митохондрий в цикле превращения NO и активных форм азота (АФА) [2], влияние экзогенного NO на митохондриальный путь метаболизма АФК и АФА исследовано недостаточно. Мало изученной остается и роль NO в регуляции МРТР, в условиях целого организма. Поэтому целью нашей работы было изучить влияние разных доз донора NO, нитроглицерина (НГ) *in vivo* на накопление Ca^{2+} , открытие МРТР и продукцию АФК и АФА в митохондриях сердца крыс.

Материал и методы исследования. Нитроглицерин вводили внутривенно в дозах 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 мг/кг. Через 5 мин. после введения НГ сердца промывали 0,9% KCl (2° С) и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды (в ммоль/л): 250 сахарозы, 20 трис-НСl буфера, 1 ЭДТА, pH 7,4. Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин. (700g, 4° С), затем супернатант – 15 мин. (11000g, 4° С). Белок определяли по Лоури.

Ca^{2+} -емкость определяли спектрофотометрически при 654 нм в

присутствии 50 мкмоль/л арсеназо-III в среде (в ммоль/л): 120 KCl, 1 KH_2PO_4 , 1 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 1 MgCl_2 , 0,1 CaCl_2 , 20 трис-HCl буфера (pH 7,4) и выражали в нмоль Ca^{2+} на 1 мг белка. Концентрацию стабильных метаболитов NO, нитрита (NO_2^-), нитрата (NO_3^-) и нитрозотиолов (НТ) определяли спектрофотометрически методом Грисса, как описано нами ранее [3]

Содержание гидропероксида (H_2O_2) определяли спектрофотометрически в КЛ/лактопероксидазной системе в фосфатном буфере (pH 7,3), 353 нм, ϵ 26000 моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$ [3]. Количество диеновых конъюгатов определяли по поглощению гептановых экстрактов проб при 232 нм [3]. Содержание свободного железа (Fe^{2+}) определяли с помощью набора реактивов («Филисгт Диагностика», Украина). В работе использованы реагенты фирмы "Sigma" (США), и реактивы отечественного производства марки ч.д.а. Растворы готовили на бидистиллированной воде. Достоверность оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Величину $p < 0,05$ считали статистически значимой.

Результаты и их обсуждение. Выводы об изменении уровня АФК и АФА под действием НГ делали, исходя из содержания стабильных метаболитов: NO_2^- , NO_3^- , нитрозотиолов (НТ) и гидропероксида (H_2O_2) в изолированных митохондриях.

Таблица 1. - Влияние нитроглицерина (мг/кг) на Ca^{2+} -емкость и содержание нитрата, нитрозотиолов, гидропероксида, железа и диеновых конъюгатов (ДК) в митохондриях сердца крыс. $M \pm m$; $n=6$, $p < 0,05$

Доза НГ	NO_3^- , нмоль/мг	НТ, нмоль/мг	H_2O_2 , пмоль/мг	Fe^{2+} , нмоль/мг	диеновые конъюгаты, нг/мг	Ca^{2+} - емкость, нмоль/мг
0	$0,04 \pm 0,006$	$0,58 \pm 0,03$	$95 \pm 7,4$	$0,12 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,3$	$38,2 \pm 6,2$
0,25	$0,29 \pm 0,04$	$0,8 \pm 0,2$	154 ± 18	$0,43 \pm 0,06$	$14,8 \pm 2,0$	$50,0 \pm 3,6$
0,5	$0,9 \pm 0,09$	$1,1 \pm 0,1$	170 ± 22	$0,93 \pm 0,15$	$25,9 \pm 3,6$	$93,5 \pm 3,5$
1,0	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	221 ± 31	$3,5 \pm 0,5$	$33,2 \pm 4,2$	$92,6 \pm 4,6$
1,5	$1,3 \pm 0,2$	$1,26 \pm 0,07$	270 ± 42	$6,2 \pm 0,7$	$60,5 \pm 9,0$	$90,8 \pm 9,5$

Как показывают данные таблицы, дозо-зависимое повышение Ca^{2+} -емкости под действием НГ хорошо коррелирует с активацией метаболизма АФА и АФК в митохондриях, причем повышение продукции АФА является очевидным результатом активации митохондриальной NO-синтазы (mtNOS), судя по

установленному нами повышению уровня L-цитруллина, продукта превращения L-аргинина NO-синтазой, от $0,45 \pm 0,05$ до $5,9 \pm 0,7$ нмоль/мг соответственно в контроле и в дозе 1 мг/кг НГ. Активация NOS сопровождается резким повышением как уровня депонирования NO в виде НТ, так и уровня свободных АФА (таблица).

При этом уровень NO_2^- остается крайне низким, а соотношение $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ резко падает от 0,18 в контроле до 0,014 ($p < 0,05$) при введении 1 мг/кг НГ. Таким образом, под действием экзогенного NO происходит активация митохондриального синтеза NO при усилении окислительных процессов, результатом которых является окисление свободных АФА до конечного продукта, нитрата.

Об активации реакций окисления в первую очередь свидетельствует дозозависимое повышение содержания продуктов ПОЛ, диеновых конъюгатов (ДК), которое хорошо коррелирует с повышенным образованием стабильного метаболита АФК, гидропероксида (таблица).

Закономерно предположить, что одной из основных причин гиперпродукции АФА и АФК является повышенное накопление Ca^{2+} (таблица), ведущее к активации митохондриальных Ca^{2+} -зависимых ферментов: mtNOS и дегидрогеназ. Ранее мы показали, что NO полностью блокирует MPTP *in vitro* [3]. Оценка функциональной активности MPTP после введения НГ по циклоспорин-чувствительному выходу Ca^{2+} из митохондрий показала значительное, на 65% ($p < 0,05$) подавление MPTP *in vivo*, что соответственно приводит к повышению накопления Ca^{2+} в митохондриях.

В то же время, наиболее резкая активация окислительных реакций отмечается в области высоких доз НГ (0,5-1,5 мг/кг), при которых уже не происходит дальнейшего повышения Ca^{2+} -емкости, однако, наблюдается многократное возрастание уровня ионизированного железа, Fe^{2+} (таблица). Заметна корреляция между высвобождением Fe^{2+} , образованием АФК, повышением уровня ДК и окислением свободных АФА до NO_3^- . Известно, что железо, взаимодействуя с H_2O_2 , является катализатором образования высокотоксичных АФК, таких как $\cdot\text{OH}$ -радикал.

Взаимодействие с АФК приводит также и к окислительным превращениям

самого железа, причем обе его формы, как окисленная (Fe^{3+}), так и восстановленная (Fe^{2+}), взаимодействуют с АФК с образованием высокотоксичных активных продуктов.

Для объяснения наблюдаемых закономерностей в качестве рабочей гипотезы можно предположить, что под действием донора NO в митохондриях, вследствие блокирования МРТР и повышения Ca^{2+} -емкости, создаются предпосылки как для повышения уровня АФА вследствие активации mtNOS, так и для прогрессивного нарастания количества токсичных АФК, при высоких дозах НГ, уже без участия Ca^{2+} , вследствие циклического окислительно-восстановительного превращения железа, Fe^{3+} -цикла.

Наращение уровня токсичных АФК многократно усиливает оксидативное повреждение митохондрий.

Заключение. Таким образом, особенности митохондриального метаболизма АФК и АФА под действием донора NO заключаются в многократном усилении их продукции вследствие блокирования МРТР и повышенного накопления Ca^{2+} в матриксе.

Результаты эксперимента также выявляют важную в физиологических условиях роль МРТР в предотвращении Ca^{2+} -перегрузки митохондрий и гиперпродукции АФК.

Литература:

1. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // *Physiol. Rev.* – 2007. – 87. – P. 99-163.
2. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: "Наука", - 1998. – 159 с.
3. Акопова О.В., Коцюруба А.В., Ткаченко Ю.П., Сагач В.Ф. Оксид азота угнетает открытие митохондриальной поры и повышает кальциевую емкость митохондрий *in vivo* // *Фізіол. Журн.* – 2005. – 51, №3. – С. 3-11. – (на укр. языке)